

## 宮城県仙北地方の温泉水におけるレジオネラの汚染 状況調査

著者	黒川 忠
雑誌名	東北大学医療技術短期大学部紀要 = Bulletin of College of Medical Sciences, Tohoku University
巻 号	6 1
ページ	1-10
発行年	1997-01-31
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/33629">http://hdl.handle.net/10097/33629</a>

## 宮城県仙北地方の温泉水におけるレジオネラの 汚染状況調査

黒川 忠

東北大学医療技術短期大学部衛生技術学科

### *Legionellae* Pollution of Hot Spring Water in Northern Miyagi Prefecture

Tadashi KUROKAWA

Department of Medical Technology, College of Medical Sciences, Tohoku University

Key words: *Legionellae*, Hot spring, PCR

*Legionellae* pollution of hot spring water in northern region of Miyagi Prefecture was examined. In 12 of 42 samples, bacteria belonging to the genus *legionellae* was detected. The *legionellae*-positive rate was 8.3% in the hot spring water reservoir tower containing water from source, 28.0% in water flowing to the tub and 80.0% in the tub water. Viable numbers of *legionellae* in the hot springs ranged widely from 20 to  $10^4$  colony forming units per 100 ml of sample. Identification of isolates was performed using a polymerase chain reaction (PCR) method with both LEG, a *legionellae* genus-specific primer and Lmip, a *L. pneumophila* species-specific primer.

A slide agglutination test, using a commercial anti-sera, identified *L. pneumophila* (serogroups 2, 3, 4, 5 and 6) and *L. dumoffii*. Species of *L. oakridgensis* and *L. sainthelensi* were identified by microplate hybridization using the DDH *legionellae* "Kyokuto" kit.

#### はじめに

レジオネラ菌は1976年7月、米国フィラデルフィアで開かれた米国在郷軍人大会で223名が原因不明の肺炎に罹患し、そのうちの34名が死亡するという集団発生事件の起因菌として、はじめて検出された菌種である。レジオネラ属菌種としてこれまで40菌種が、患者以外に土壌、河川、湧水などの自然環境や水道水、冷却塔および給湯器内の水といった人工的な環境から見い出されており、我々を取り巻く環境に広く分布していることが確認されている。レジオネラ症としては、細菌性肺炎を主徴とする呼吸器感染症<sup>1)</sup>、肺炎の型を

とらず発熱、頭痛、筋肉痛などを主徴とする熱性疾患 Pontiac fever<sup>2)~4)</sup> や化膿性疾患<sup>5)</sup> が報告されているが、肺炎型をとる呼吸器感染症が頻度的に多く、わが国で報告されているほとんどの症例も肺炎型である。

最近、外国でレジオネラ属菌に汚染された whirl pool spa でのレジオネラ症患者の集団発生が報告され、わが国でも藪内らは全国40の温泉中17箇所の温泉の温泉水よりレジオネラ属菌が検出されたと報告<sup>6)</sup> し、注目されている。

今回、宮城県内仙北地域の温泉水のレジオネラ汚染状況を調査したので、その結果を報告する。

## 調 査 対 象

宮城県内仙北地域の温泉旅館や保養施設の温泉水を対象に 30 施設 42 検体について調査した。宮城県北というと鳴子という大規模な温泉郷が広く知られているが、片寄りをなくすために図 1 のようにその他の地域からも出来る限り検体を採取した。

検体は貯湯槽、浴槽への流出口および浴槽の 3 箇所から直接滅菌容器に採取した。貯湯槽、浴槽への流出口および浴槽の 3 箇所すべてから検体を採取したのは 1 施設のみであり、多くの施設はそのいずれかである。検体の性状を表 1 に示したが、種々の泉質のものを含み、採取時の検体の温度 3°C~80°C, pH は 2.6~9.6 までを含む。調査期間は平成 7 年 12 月より平成 8 年 3 月までである。

## 方 法

搬入された検体はその日のうちに各培地に接種した。

### 1) レジオネラの分離同定

レジオネラ検出方法の概要を図 2 に示した。

検体 200 ml を 6,000 rpm, 30 分遠心しその沈渣を 1 ml の滅菌水に懸濁した。その菌液 300  $\mu$ l に 0.2 M KCl-HCl 溶液 (pH 2.2) を等量加え、室温で 10 分間放置し前処理を行った。その 100  $\mu$ l を B-CYE $\alpha$  寒天平板 (栄研化学) および WYO $\alpha$  (Wadowsky-Yee-Okuda 培地) 寒天平板 (栄研化学) に滴下、コンラージ棒で均一に広げ 37°C で 7 日間培養し、レジオネラ属菌のスクリーニングを行った。48 時間以降に出現したコロニーの肉眼的観察により異なる性状のものを選りグラム染色を行った。グラム陰性の両端がやや細くなったしなやかな桿菌について、B-CYE $\alpha$  培地と血液寒天で純培養し、血液寒天には発育せず B-CYE $\alpha$  培地にのみ発育したものを推定陽性とした。

一方、*L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii* および *L. anisa* などは平板に紫外線 360 nm を照射し、そのコロニーが青白色蛍光を発することで、その存在を推定した。

レジオネラ推定陽性検体の同定は PCR 法で



図 1. 検体採取地の分布

行った。純培養した平板より被検菌 1 白金耳量を滅菌水 0.3 ml に懸濁し、94°C, 10 分加熱処理したのち、チビタン (ミリポア) で遠心し、変性蛋白などを除いたものを PCR の試料とした。レジオネラ属特異的プライマーは江崎らの報告<sup>7)</sup>に従い LEG プライマー (LEG448-A, 5'-GAG GGT TGA TAG GTT AAG AGC-3'; LEG854-B, 5'-CGG TCA ACT TAT CGC GTT TGC T-3') を用い、PCR 条件として 95°C 30 秒, 59°C 60 秒, 74°C 60 秒を 25 サイクル行って 16S リボゾーム RNA 遺伝子中の 430 bp を増幅した後、NuSieve GTG agarose (FMC) の 3% ゲルにて電気泳動を行い、ゲルをエチジウムブロマイドにて染色し、レジオネラ属特異的なバンドを確認した。

また、*L. pneumophila* 菌種の同定も Mahbubani らの報告<sup>8)</sup>に従い、PCR 法で行った。すなわち、*L. pneumophila* macrophage infectivity potentiator (mip) 遺伝子をターゲットとし Lmip920 (5'-GCT ACA GAC AAG GAT AAG TTG-3') と Limp R1548 (5'-GTT TTG TAT

温泉水のレジオネラ菌汚染状況

表 1. 検体の採取場所とその性状

NO	採取場所	泉質	源泉温度	採水時温度	pH
L1	貯湯槽	単純泉	51	51	7.5
L2	貯湯槽	単純泉	32	32	7.6
L3	貯湯槽	低張性中性高温泉	57	57	7.6
L4	流出口	低張性中性高温泉		57	7.1
L5	流出口	低張性中性高温泉		50	6.2
L6	流出口	単純泉		42	6.2
L7	流出口	純重曹泉		54	6.5
L8	貯湯槽	硫酸塩泉低張性弱アルカリ性高温泉	68	68	7.3
L9	貯湯槽	硫酸塩泉低張性弱アルカリ性高温泉	72	72	7.1
L10	流出口	トロン温泉（弱アルカリミネラル泉）		42	7.6
L11	貯湯槽	単純泉	25	3	9.6
L12	流出口	緑礬鉄泉	19	47	6.8
L13	貯湯槽	緑礬鉄泉	18	18	6.9
L14	流出口	高張性弱アルカリ性ナトリウム塩化物泉	38	43	8.0
L15	流出口	単純泉 冷鉱泉	15	20	7.1
L16	貯湯槽	単純泉	20	11	8.4
L17	貯湯槽	低張性アルカリ性冷鉱泉	16	16	9.2
L18	流出口	低張性中性冷鉱泉 単純泉	14.5	43	7.2
L19	流出口	単純ケイ酸泉低張性中性低温泉	27	7	8.0
L20	流出口	単純ケイ酸泉低張性中性低温泉		18	7.4
L21	流出口	ナトリウムカリウム塩化物泉 低張性弱アルカリ性温泉	34	48	7.7
L22	貯湯槽	ナトリウム塩化物泉高張性中性高温泉	68	65	6.6
L23	流出口	ナトリウムカリウム塩化物泉等張性中性高温泉	60.2	42	7.5
L24	流出口	単純温泉低張性弱アルカリ性高温泉	42.2	42	8.2
L25	流出口	ナトリウム塩化物泉低張性弱アルカリ性高温泉	98	61	8.4
L26	流出口	ナトリウム塩化物泉低張性アルカリ性高温泉	92.2	80	7.4
L27	流出口	アルカリ性単純温泉低張性アルカリ性高温泉	66.5	57	8.6
L28	流出口	アルカリ性単純温泉低張性アルカリ性高温泉	86	55	8.5
L29	流出口	アルカリ性単純温泉低張性アルカリ性高温泉	98	67	7.5
L30	流出口	硫黄泉		47	2.6
L31	流出口	ナトリウム塩化物泉低張性弱アルカリ性高温泉	44	42	7.9
L32	流出口	石膏硫化水素泉	30.5	49	3.8
L33	浴 槽	石膏硫化水素泉	30.5	42	3.8
L34	流出口	ナトリウム硫酸塩・塩化物泉低張性アルカリ性高温泉	82	57	6.5
L35	貯湯槽		(15)	12	7.5
L36	浴 槽	含硫黄ナトリウム・カルシウム塩化物泉 等張性弱アルカリ性冷鉱泉	19	38	6.9
L37	浴 槽	含硫黄ナトリウム・カルシウム塩化物泉 等張性弱アルカリ性冷鉱泉	19	38	6.9
L38	流出口		26.6	12	8.2
L39	貯湯槽	ナトリウム塩化物泉低張性弱アルカリ性高温泉	56.2	58	7.2
L40	流出口	ナトリウム塩化物泉低張性弱アルカリ性高温泉		48	7.8
L41	浴 槽	ナトリウム塩化物泉低張性弱アルカリ性高温泉		42	7.9
L42	浴 槽	ナトリウム塩化物泉低張性弱アルカリ性高温泉		42	7.8

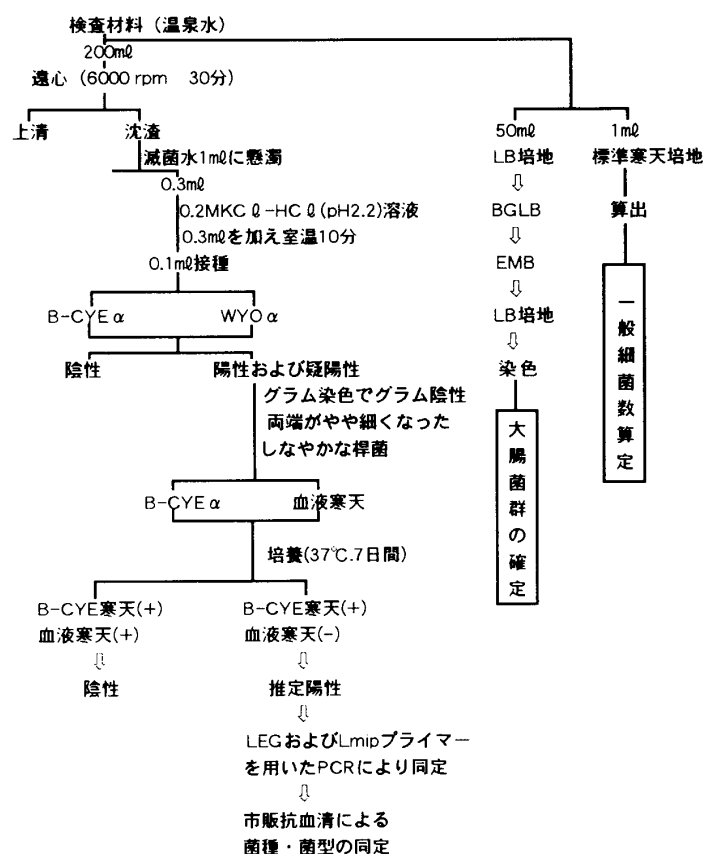


図 2. レジオネラ検出方法の概要

GAC TTT AAT TCA-3') をプライマーとして用い 630 bp の断片を増幅した後、3% アガロースゲルで電気泳動しエチジウムブロマイドにて染色した。この場合の PCR 条件は 94°C 60 秒, 50°C 60 秒, 72°C 120 秒, 25 サイクルの条件で行った。PCR の反応液は水 69.5  $\mu$ l, 10 $\times$ PCR buffer 10  $\mu$ l, dNTP 8  $\mu$ l, primer 2  $\mu$ l, Taq DNA ポリメラーゼ 0.5  $\mu$ l (2.5 u) に試料 10  $\mu$ l を加えた。

また、一部の試料については、水 65.5  $\mu$ l, 10 $\times$ PCR buffer 10  $\mu$ l, dNTP 10  $\mu$ l, LEG および Lmip プライマーを 4  $\mu$ l, Taq DNA ポリメラーゼ 0.5  $\mu$ l (2.5 u) に試料 10  $\mu$ l 加え 94°C 60 秒, 50°C 60 秒, 72°C 120 秒を 25 回繰り返す条件で PCR (multiplex PCR) を行い、一度の PCR によりレジオネラ属菌であるかと同時に *L. pneumophila* であるかを確認した。

市販の抗血清(デンカ生研)は、*L. pneumophila* 1~6 群, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*,

*L. micdadei* のみで、これらの菌種については、のせガラス凝集反応により同定した。

抗血清の市販されていない一部の菌種については、ハイブリダイゼーション法を用いた DDH レジオネラ極東キット(極東製薬)を用いて同定した。

## 2) 大腸菌群の同定

検体をそのまま試料とし水道水質検査法に準じて行った。

3 倍濃厚 LB 培地に検体 50 ml を加えて 36°C 48 時間培養後、ガスの発生した材料を BGLB 培地に 1 白金耳接種して同様に 36°C 48 時間培養した。以後、各段階の陽性材料を EMB 培地⇒LB 培地⇒グラム染色と指示通りに進め、染色で「グラム陰性無芽胞桿菌」の観察された試料を陽性とした。

## 3) 一般細菌群の算定

検体をそのまま試料とし水道水質検査法に準じ

て行った。2枚のペトリ皿に試料1mlずつ採り、約50℃に暖めた標準寒天培地15mlを加え混和後36℃24時間培養して出現したコロニー数を数えた。2枚のペトリ皿の平均コロニー数を一般細菌数とした。

## 結 果

各検体の一般細菌数、大腸菌群の有無、WYO $\alpha$ 培地上のコロニー数を表2に示した。検体15, 18, 19, 33のWYO $\alpha$ 培地上のコロニーはすべて真菌やレジオネラ以外の細菌であった。今回の調査では42検体中12検体からレジオネラ菌が検出された。

レジオネラ推定陽性検体の平板より1～6コロニーを純培養し、LEGおよびLmipプライマーによるPCRを行った結果が表3である。コロニー6W-1のように、LEGとLmipに特異的なバンドがみられたものについては市販の抗血清との凝集反応により血清型6と同定された。コロニー6W-2のようにLEGプライマーに特異的なバンドが確認され、Lmipに特異的なバンドのみられないものでも、その平板に紫外線を照射することにより特徴的な青白色の蛍光を発し、凝集反応により*L. dumoffii*と同定されたものもある。

また、コロニー10W-1のようにLEGとLmipプライマーの両方で特異的なバンドがみられるが市販の抗血清による凝集反応で凝集のみられないものについては消去法により*L. pneumophila*の血清群1～6群以外の血清型であると考えられる。

さらに、コロニー2W-1や36W-1のようにLEGプライマーによるPCRで特異的なバンドがみられ、LmipプライマーによるPCRで特異的なバンドのみられないものについては、*L. pneumophila*以外の菌種と考えられるが、これらについてはハイブリダイゼーション法を用いたDDHレジオネラ極東キットによりそれぞれ*L. saintheni*, *L. oakridgensis*と同定した。

今回の調査した検体を貯湯槽、浴槽への流出口および浴槽からの検体とに分けた場合、貯湯槽では12検体中1検体(8.3%)のみがレジオネラ陽性であり、流出口からの検体では25検体中7検体

表2. 各検体の一般細菌数、大腸菌群の有無、およびWYO $\alpha$ 培地上のコロニー数

NO	一般細菌数 /ml	大腸菌群	WYO $\alpha$ 上のコロニー数 ( $\times 20/200$ ml)
L1	1	—	0
L2	221	—	2
L3	4	—	0
L4	0	—	0
L5	0	—	0
L6	23	—	6
L7	12	+	0
L8	0	—	0
L9	0	—	0
L10	800	—	346
L11	17	—	0
L12	0	—	0
L13	0	—	0
L14	245	—	302
L15	450	+	1
L16	326	+	0
L17	340	+	0
L18	$8.8 \times 10^5$	+	4
L19	16	—	17
L20	1	—	0
L21	778	+	226
L22	0	—	0
L23	302	—	1000
L24	1	—	0
L25	1	—	0
L26	1	—	0
L27	2	—	0
L28	1	—	0
L29	4	—	0
L30	3	—	0
L31	$9.5 \times 10^4$	—	0
L32	0	—	0
L33	34	+	7
L34	0	—	0
L35	0	—	0
L36	195	+	16
L37	486	+	約 700
L38	0	—	2
L39	0	—	0
L40	1	—	7
L41	24	+	314
L42	0	—	38

表 3. レジオネラ陽性検体中の菌種・菌群の同定

検体	コロニー	PCR		市販の抗血清との凝集反応の結果	備 考
		LEG	Lmip		
L2	2W-1	+	—	—	<i>L. sainthelensi</i> .
L6	6B-1	—			
	6W-1	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG6	
	6W-2	+	—	<i>L. dumoffii</i>	
	6W-3	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG6	
L10	10W-1	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *.
	10W-2	—	—		
	10W-3	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG3	
	10W-4	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	
L14	14W-1	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG2	
	14W-2	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG2	
	14W-3	—			
	14W-4	—			
L21	21B-1	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG4 : 5	
	21W-1	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	
	21W-2	+	+		<i>L. pneumophila</i> *
	21W-3	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	
	21W-4	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG5	
	21W-5	+	—	—	<i>Legionella</i> spp.
L23	23W-1	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
	23W-2	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG4	
	23W-3	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG4	
	23W-4	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
	23W-5	+	+	<i>L. pneumophila</i> SG4	
L36	36W-1	+	—	—	<i>L. oakridgensis</i> .
	36W-2	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
	36W-3	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
	36W-4	+	—	—	<i>Legionella</i> spp.
L37	37W-1	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
	37W-2	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
	37W-3	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
	37W-4	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
L38	38W-1	+	—	—	<i>Legionella</i> spp.
	38W-2	+	—	すべてに+	<i>Legionella</i> spp.
L40	40B-1	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
	40B-2	+	+	すべてに+	
	40W-1	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
	40W-2	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
L41	41W-1	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
	41W-2	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
	41W-3	+	—	すべてに+	
	41W-4	+	—	—	<i>Legionella</i> spp.
L42	42W-1	+	—	すべてに+	<i>Legionella</i> spp.
	42W-2	+	+	すべてに+	
	42W-3	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *
	42W-4	+	+	—	<i>L. pneumophila</i> *

\**L. pneumophila* SG1～6 以外の血清群

表 4. 検体別レジオネラ検出率

	貯湯槽	流出口	浴槽	計 (平均)
レジオネラ陽性検体数 全検体数	1/12	7/25	4/5	12/42
検出率 (%)	8.3	28.0	80.0	(28.6)

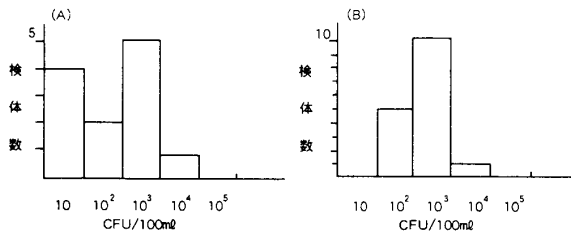


図 3. レジオネラ陽性検体における菌数分布  
(A) 今回の調査でレジオネラ陽性の 12 検体 (貯湯槽, 流出口, 浴槽)  
(B) 主に仙台市の 7 施設 16 検体 (浴槽)

(28.0%), 浴槽では 5 検体中 4 検体 (80.0%) であった (表 4)。

レジオネラ陽性検体における菌数分布は図 3 (A) の通りである。検体 100 ml あたり 10, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> CFU 検体が 4:2:5:1 の割合であり, 10 のオーダーの検体はいずれも貯湯槽と流出口からの検体であった。

次に multiplex PCR<sup>9)</sup> を検討した。すなわちレジオネラ属の特異的な LEG primer と *L. pneumophila* 菌種特異的なプライマーの Lmip primer を同時に反応系に加え, Tm の低い Lmip primer の annealing temp. 50°C に annealing temp. を設定することにより非特異的なバンドもみられず, 3% アガロースゲル電気泳動にて 430 bp と 620 bp のバンドを *L. pneumophila* において同時に確認することができた (図 4)。ただ LEG primer と Lmip primer のアニーリング温度に 10°C 近い差があり, 一度の PCR による両断片の確認において Tm の低い Lmip により増幅される 620 bp の断片は 430 bp の断片より PCR による増幅効率が悪く, エチジウムブロマイドによる染色でより弱い (薄い) バンドとして認められた。

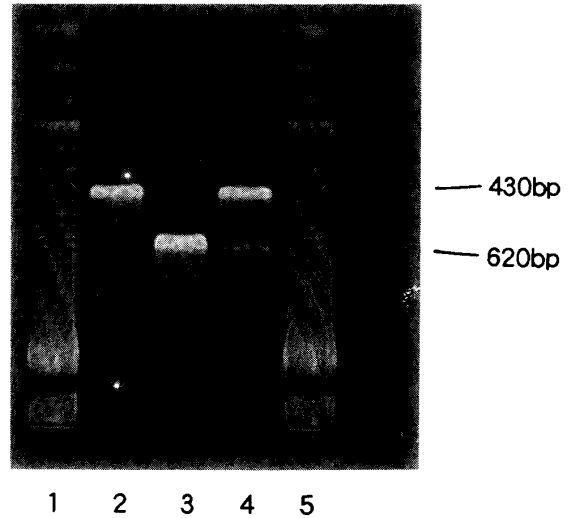


図 4. *L. pneumophila* PCR 産物の電気泳動  
(3% アガロースゲル)  
Lane 1, 5 分子量マーカ (50 Base Pair Ladder)  
2 LEG プライマーによる PCR 産物  
3 Lmip プライマーによる PCR 産物  
4 LEG および Lmip プライマーによる multiplex PCR 産物

## 考 察

1986 年 Dutka ら<sup>10)</sup> により, はじめて温泉水よりレジオネラ菌が分離され, 温泉水のレジオネラ菌による汚染が注目された。1989 年 Bornstein ら<sup>11)</sup> は温泉水よりレジオネラ菌を分離するとともに, 温泉施設従業員にレジオネラ肺炎が発症したと報告している。レジオネラ症は, フィラデルフィア市のホテルで開催された在郷軍人大会での集団発生でも明らかのように感染防御能の低下したヒトに併発する日和見感染症としてみられる頻度が高い。今年 7 月に某大学病院で新生児室の給湯口, 加湿器, ミルク加温器などがレジオネラ菌に汚染され, 断生児 11 名が発熱などの症状を示し, うち 1 名が肺炎で死亡するという院内感染が大きく報道されたのはご存じの通りである。日本では温泉の利用は観光やレジャーの他に病後のリハビリテーションを兼ねた利用者や高齢者の湯治のための利用も多いことを考えれば, 温泉水のレジオネラ菌の汚染状況調査は重要である。レジオネラ菌は水中, なかでも冷却塔から発見されてお



り、これまではレジオネラの感染経路として水がエアゾル化した時に周囲の大気が汚染されることによる経気道感染が考えられていたが、レジオネラ症の40%は本菌に汚染された水を飲んだ後に発症しているという疫学上の結果もある。わが国においても温泉水の誤嚥により発症したと考えられるレジオネラ肺炎の症例が報告されている<sup>12)</sup>が、今回の調査でも一部の施設では冷鉱泉を利用してお茶として飲んでおり、また利用客の8~9割はポリ容器を持参し、飲料水とは認められていないにもかかわらず飲料水として持ち帰るという施設があり注意を要する。

今回の調査により42検体中12検体よりレジオネラ菌が検出され、検出率は28.6%であった。最近、藪内らは内湯、露天風呂を含む浴槽水135検体中のうち62.7%に相当する84浴槽からレジオネラ菌を検出している<sup>13)</sup>。また、仙南保健所によると県内仙南地域に位置する施設の浴槽水24検体中18検体(75.0%)からレジオネラ菌を検出しているが、これらの報告と比較すると今回の調査では検出率が低い。しかし、今回の調査した検体を貯湯槽、浴槽への流出口および浴槽からの検体とに分けた場合、表4から明らかなように貯湯槽、流出口、浴槽の順にレジオネラの検出率が高くなる傾向がみられた。貯湯槽からの検体採取については11検体中9検体が貯湯槽の上部より汲み取り、1検体は貯湯槽の下部(地面より20~30 cm位の高さ)に取り付けられた蛇口より採取、残りの1検体は冷鉱泉であり杉の木の根元の湧き水を採取した。貯湯槽からの検体で唯一のレジオネラ菌陽性検体は常時、蛇口より温泉水を流出している貯湯槽の下部に取り付けられた蛇口から採取したものであり、これは蛇口部分の汚染も考えられる。以上の考察より今回の調査においてレジオネラ菌の検出率が他の報告より低いのは検体として貯湯槽や流出口からの検体が含まれていたためと考えられる。

次にレジオネラ陽性検体における菌数分布を調べてみると検体100 mlあたり $10$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$  CFU 検体が4:2:5:1の割合であり(図3A)、 $10$ のオーダーの検体はいずれも貯湯槽と流出口から

の検体であった。現在、主に仙台市内の温泉の浴槽中のレジオネラ汚染を調査しているが、7施設16検体を調べ、すべての検体よりレジオネラ菌が検出されているが、その菌数分布は $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ の検体がそれぞれ5:10:1であり $10$ のオーダーの検体はみられなかった(図3B)。このように貯湯槽、流出口、浴槽の順にレジオネラ菌の検出率が高く、また菌数も多く認められることが明らかとなった。このことはレジオネラの汚染は貯湯槽以降であり、浴槽内では一定期間貯留されており、また、より発育に適した温度の保持や温泉水の循環などにより生育環境が整い増殖、さらに入浴などによりレジオネラ菌の検出率が高くなるものと考えられる。

各検体につき検出同定した菌種、菌型(表3)を整理したものが表5である。検体6や36のように*L. pneumophila*とその他のレジオネラ属菌種が共存するものや検体10のように血清型の異なる*L. pneumophila*が共存するものもみられた。温泉水からは*L. pneumophila*血清型4、冷却塔の水からは血清型1の分離頻度が高いとの報告<sup>14)</sup>もあるが、今回の調査では特に4型が多いという結果は得られなかった。しかし、今回は1検体につき1~6コロニーについて菌種、菌型の同定を行ったが、同定するコロニー数を増やすことによりさらに複数の菌種、菌型の存在が明らかになる可能性がある。

また今回、WYO $\alpha$ 平板上のレジオネラ菌らしいコロニーを1検体あたり1~6コロニーひろい、純培養し、レジオネラ属の菌種であるかPCRにより同定を試みた。レジオネラ属の菌株については、もっとも分離頻度の高い*L. pneumophila*であるかをさらにPCRで確認を行ったが、この操作を一度のPCRで行えないか検討を加えた。レジオネラ検出同定用プライマーとして今回用いたLEGおよびLmipプライマーのほかにM.N. Stranbachら<sup>15)</sup>の*L. pneumophila*に特異的な塩基配列(遺伝子は未同定)のLP-A, B primerを用いて800 bpの増幅、またM.C. Mahbubaniらの*Legionella* spp.に特異的なリボゾーム5SRNAの塩基配列104 bpを検出するL5S-L9,

表 5. レジオネラ陽性検体の推定菌数と同定菌種および菌群

検体	WYO <sub>α</sub> 平板上のレジオネラと推定されるコロニー数 (個/検体 100 ml)	同定菌種・菌群
L2	20	<i>L. saintelensis</i>
L6	60	<i>L. pneumophila</i> SG6 <i>L. dumoffii</i>
L10	3,460	<i>L. pneumophila</i> SG3 <i>L. pneumophila</i> SG5 <i>L. pneumophila</i> *
L14	3,020	<i>L. pneumophila</i> SG2
L21	2,260	<i>L. pneumophila</i> SG2 <i>L. pneumophila</i> SG4, 5 <i>L. pneumophila</i> * <i>Legionella</i> spp.**
L23	10,000	<i>L. pneumophila</i> SG4 <i>L. pneumophila</i> *
L36	160	<i>L. oakridgensis</i> <i>L. pneumophila</i> * <i>Legionella</i> spp.**
L37	6,500	<i>L. pneumophila</i> *
L38	20	<i>Legionella</i> spp.**
L40	70	<i>L. pneumophila</i> *
L41	3,140	<i>L. pneumophila</i> * <i>Legionella</i> spp.**
L42	380	<i>L. pneumophila</i> * <i>Legionella</i> spp.**

\**L. pneumophila* SG1~6 以外の血清群が考えられる

\*\**L. pneumophila*, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. micdadei* 以外の菌種

L5S-R93 primer が報告されているが増幅される断片の塩基数があまり異ならず同一濃度のアガロースゲルで充分分離し、検出可能なプライマーを選択した。すなわちレジオネラ属の特異的な LEG primer と *L. pneumophila* 菌種特異的なプライマーの Lmip primer を同時に反応系に加え、Tm の低い Lmip primer の annealing temp. 50°C に annealing temp. を設定することにより非特異的なバンドもみられず、3% アガロースゲル電気泳動にて 430 bp と 620 bp のバンドを *L. pneumophila* において同時に確認する方法を確

立した (図 4)。温泉水よりもっとも頻度高く分離されるレジオネラは *L. pneumophila* であるが、その他の菌種も分離されており、さらに WYO<sub>α</sub> 培地はグラム陰性桿菌のうち、*Klebsiella pneumoniae* や *Pseudomonas aeruginosa* に対する発育抑制には優れているが、*Serratia marcescens* や *Proteus vulgaris* に対しては抑制は困難であると言われている。このような状況下で、温泉水のような環境水からのレジオネラ検出同定には、この multiplex PCR 法は一度の PCR 法によりレジオネラ属以外の菌種であるか、また、*Legionella pneumophila* であるかさらに *L. pneumophila* 以外のレジオネラ属菌種であるかを鑑別でき公衆衛生学的調査など検体数が多い場合には特に有用ではないかと考えられる。

## 謝 辞

各施設への検体採集にあたりその依頼をお願いした保健福祉部薬務課千葉規課長、塩釜保健所食品薬事課佐藤明彦課長補佐、大崎保健所食品薬事課阿部和男課長および栗原保健所食品薬事課横山実課長の皆様に深謝申し上げます。

また、宮城県保健環境センター微生物部白石広行部長および荒井富雄主任研究員には、貴重なご助言をいただくとともに抗血清による型別をして頂き、心から感謝いたします。

## 文 献

- 1) McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W. et al.: Legionnaires' Disease: Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease, N. Engl. J. Med., **297**, 1197-1203, 1977
- 2) Click, T.H., Gregg, M.B., Barnard, B. et al.: Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: 1. Clinical and epidemiologic aspects, Am. J. Epidemiol., **107**, 149-160, 1978
- 3) 森 正道, 星野啓一, 園田久子: *Legionella pneumophila* serogroup 7 による Pontiac fever の集団発生, I. 臨床所見, 感染症学雑誌, **69**, 646-653, 1995
- 4) 藪内英子, 森 正道, 斎藤 厚ほか: *Legionella pneumophila* serogroup 7 による Pontiac fever

- の集団発生例, II. 疫学調査結果, 感染症学雑誌, **69**, 654-665, 1995
- 5) Holt, P.: Legionnaires' disease and abscess of appendix, Br. Med. J., **282**, 1035-1036, 1981
- 6) 藪内英子, 王 笠, 荒川迪生ほか: 日本の温泉水中の *Legionella* 属菌の分布, 感染症学雑誌, **68**, 549-551, 1994
- 7) Yamamoto, H., Hashimoto, H. and Ezaki, T.: Comparison of detection methods for *Legionella* species in environmental water by colony isolation, fluorescent antibody staining, and polymerase chain reaction, Microbiol. Immunol., **37**, 617-622, 1993
- 8) Mahbubani, M.H., Bej, A.K., Miller, L. et al.: Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. Molecular and Cellular Probes, **4**, 175-187, 1990
- 9) Cormican, M., Glennon, M., Ni Riain, U. et al.: Multiplex PCR for identifying mycobacterial isolates, J. Clin. Pathol., **48**, 203-205, 1995
- 10) Dutka, B.J. and Evans, P.: Isolation of *Legionella pneumophila* from Canada hot springs, Can. J. Public. Health, **77**, 136-138, 1986
- 11) Borntein, N., Marmet, D., Surgot, M. et al.: Exposure to *Legionellaceae* at a hot spring spa: A prospective clinical and serological study, Epidem. Infect., **102**, 31-36, 1989
- 12) 真柴晃一, 浜本龍生, 鳥飼勝隆: 温泉水の誤嚥により発症したと考えられるレジオネラ肺炎の1症例, 感染症学雑誌, **67**, 163-166, 1993
- 13) 特集, 温泉とレジオネラ感染症. Medical Tribune 1996年2月8日号, p.29-p.33
- 14) 池戸正成: 環境水からのレジオネラ属菌の分離法, 臨床検査, **30**, 1081-1085, 1986
- 15) Stranbach, M.N., Falkow, S. and Tompkins, L.S.: Species-specific detection of *Legionella pneumophila* in water by DNA amplification and hybridization, J. Clin. Microbiol., **27**, 1257-1261, 1989